

Válasz Prof. Dr. Berki Tímea bírálataira

Köszönöm Berki Tímea Professzor Asszonynak dolgozatom bírálatait, az ábrákkal és a dolgozat formájával kapcsolatos kritikai megjegyzéseit, melyekkel egyetértek.

Feltett kérdéseire a válaszaim:

- 1. A jelölt még a biológusok között is kevesek által ismert modellt, az ecetmuslica lárvákat felhasználva vizsgálja a veleszületett immunrendszer működését. Ezzel egy speciális szaknyelvet használ, tele rövidítésekkel, ami a bíráló számára nem mindenhol könnyen érthető. Ezt tovább nehezítette, hogy nem minden rövidítést találtam meg a jegyzékben.**

Egyetértek bírálómnak azzal a megjegyzésével, hogy a veleszületett immunválasz ecetmuslica modellrendszerben történő vizsgálatát leíró speciális szaknyelv, rövidítések használata nélkül könnyebben érthetővé tette volna a dolgozatban leírtakat. Sajnálom, hogy a jegyzékben nem szerepelt minden rövidítés.

- 2. Monoklonális ellenanyagok előállítása *Drosophila* lárvák hemocitáinak immunizálásával történt, amely minden típusát és fejlődési stádiumát reprezentáló sejt keverék. Ha szeparált sejtcsoportokkal történt volna az immunizálás vajon más markerek ellen kapott volna-e immunválaszt és ellenanyag termelődést?**

A *Drosophila* hemocitái a gerincesek vérsejtjeivel összevetve sokkal érzékenyebbek *ex vivo* körülmények között, így a Percoll, vagy Ficoll gradiens centrifugálással történő szeparálásuk nem megoldott. A kristály sejtek *in vitro* körülmények között rövid időn belül szétesnek, viszont a plazmatociták és a lamellociták ellenállóbbak és eltérő adhéziós képességük alapján szétválaszthatók. A lamellociták kevésbé tapadnak ki az üveg vagy plastik felületre, mint a plazmatociták, így létrehozhatók lamellocita, illetve plazmatocita dús vérsejt szuszpenziók. A vérsejtek FACS-sal történő szeparálása és a különböző alpopulációk izolálása egyrészt a munkánk során előállított és más laboratóriumok által is általánosan használt ellenanyagokkal, másrészt transzgenikus riporter géneket hordozó *Drosophila* törzsek előállításával szintén lehetségessé vált. Ezekkel a módszerekkel előállíthatók olyan hemocita alpopulációk, melyekben az alul reprezentált hemocita fejlődési alakon megnyilvánuló antigének feldúsulnak, így ezek ellen is további ellenanyagokat lehetett volna előállítani. Ismereteink szerint más laboratóriumokban próbálkoztak hemocitákból izolált fehérje frakciókkal történő immunizációt követően hibridómák előállításával, azonban az ilyen irányú megközelítések nem vezettek eredményre.

A sejtfúzióval előállított hibridóma kultúrák felülúszóinak átvizsgálása során olyan nagyszámú, a hemociták különböző alpopulációival reagáló ellenanyaghoz jutottunk, hogy a

keringésből származó hemocita alpopulációkkal nem végeztünk további immunizálást. Az előállított ellenanyagok repertoárját, azaz újabb marker molekulák azonosítását azzal kívántuk elérni, hogy a keringő hemocitkon kívül, a lárva szesszilis szövetével, illetve a központi vérképző szerv, a lymph gland-ből származó hemocitákkal is végeztünk immunizálást és sejtfúziót. Ezeknek a kísérleteknek az eredményeként újabb hemocita specifikus molekulákat azonosítottunk, azonban a kapott ellenanyagok repertoárja alapvetően nem különbözött a teljes véresejtpopulációval történt immunizálás eredményeként kapott ellenanyagokétól. A kapott markerek alkalmazásával elértük a célunkat, az immunológiai markerek azonosítását és alkalmazását a vérsajt funkcionális heterogenitásának vizsgálatához.

3a. Lehetséges-e az egyes hemocita alcsoportokat FACS vagy mágneses eljárással szeparálni és azt követően *in vitro* tenyészteni?

Az egyes hemocita alcsoportok a velük specifikusan reagáló ellenanyagok direkt vagy indirekt immunofluorescenciás festését követően FACS eljárással szeparálhatók, illetve mágnesezhető golyókkal is elkülöníthetők. Az így létrehozott hemocita alpopulációk *in vitro* körülmények közötti tenyésztésével többször is próbálkoztunk, de a hemociták az újszülött borjú szérummal és glutaminnal kiegészített *Drosophila* Schneider's vagy S&S mediumban *in vitro* tenyésztve kb. egy héten belül elpusztultak. Több alkalommal próbálkoztunk hemociták *in vitro* tenyésztésével a szakirodalomban leírt légy extraktumból készített kondicionáló adalékkal vagy növekedési hormonnal kiegészített szövettenyésztő médiumokkal, de a hemociták életképességében, valamint osztódó képességében változást nem tapasztaltunk.

3b. Változik-e *in vitro* az egyes hemocita sejtcsoportok morfológiája, funkciója? Tudnak-e egymásba alakulni?

A plazmatociták *in vitro* körülmények között a szövettenyésztő edények felületére kitapadva az emlős leukocitákhoz hasonló morfológiai változásokon mennek keresztül, ellaposodnak és filopódiumokat illetve lamellipódiumokat képeznek, migrációs tulajdonságukban viszont különbséget mutatnak. Míg az emlősök leukocitái az aktin hálózatuk megnyúlási erejét használva, integrinektől független módon mind *in vivo*, mind *ex vivo* körülmények között komplex mozgásra képesek, addig a *Drosophila* hemocitái kizárólag az integrinek által biztosított adhézio segítségével képesek *in vitro* mozogni.

Mivel *in vitro* hemocita tenyészeteket nem tudtunk létrehozni, így sem a hemocita alcsoportok *in vitro* körülmények között bekövetkező morfológiai és funkcionális változásait, sem az egyes vérsajt típusok egymásba történő alakulását, melyet *in vivo* rendszerekben korábban igazoltunk, nem tanulmányoztuk *in vitro* körülmények között.

4a. Beszélhetünk-e a *Drosophilákban* az immunsejtek között sejt-sejt kommunikációról, vagy csak fagocita-mikroba kapcsolódások zajlanak?

4b. Ha létezik sejt-sejt kommunikáció, annak milyen formái ismertek és mi a szerepe az immunválaszban?

Drosophilában a parazitoid darázs petéi elleni védekezés során az immunsejtek közötti kommunikáció alapvető jelentőséggel bír a sikeres immunválasz kifejlődésében. A *Drosophila melanogaster* lárva testüregbe helyezett parazitoid darázspete sejt-közvetítette immunválaszt vált ki, melyet enkapszulációnak, vagy tokképzésnek nevezünk. A darázspete először a plazmatocitákat aktiválja. Az aktiválódott plazmatociták rátapadnak és szétterülnek a pete korion burkán. A vérsejtek között, a sejteket egymáshoz kapcsoló fehérje komplexek, sejtkapcsoló struktúrák (septate junctions) alakulnak ki, melyek a gerincesek „tight junctions” struktúrák analógjainak tekinthetők. Ezzel egy időben a darázsfertőzés egy új típusú vérsejt a lamellociták differenciálódását is kiváltja, melyek a plazmatocita burokra tapadnak, vagy magán a petén differenciálódnak a plazmatocitákból, ezután bekövetkezik a melanizációs reakció, ami a tokba zárt parazita pusztulását eredményezi. Munkánk során a hemociták között kialakuló sejt-sejt kapcsolatok kialakításáért felelős sejtadhézióban, illetve sejthalak változásban szerepet játszó gének közül a guanin nukleotid metabolizmus szabályozásában szerepet játszó *raspberry* génről láttuk be, hogy szerepe nélkülözhetetlen a parazitoid darázsak elleni sejt-közvetítette immunválaszban.

4c. Beszélhetünk-e irányított sejt-vándorlásról?

A *Drosophila* immunsejtjei képesek az irányított sejt-vándorlásra. Az egyedfejlődés embrionális szakaszában a hemociták a feji mesodermában képződnek és egy meghatározott útvonalon terjednek szét az embrióban. A hemociták irányított migrációja a bennük megnyilvánuló PVR receptor tirozin kináz, a gerinces Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)- és Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-receptor *Drosophila* homológja, valamint e receptor embrionális idegrendszerben kifejeződő ligandja, a Pvf2 és Pvf3 szabályozása alatt áll. A Pvf2 és Pvf3 molekulák kemotaktikus faktorként irányítják a hemociták migrációját az központi idegkötegek mentén, míg a hemociták migrációja során a lamellopódióriumok képződését a Rho családba tartozó kis GTP-áz Rac molekulák szabályozzák..

A hemociták migrációját külső stressz faktorok, a kutikulát érő sérülések, és fertőzések is kiválthatják. A hemociták migrációja egy komplex, több lépésben zajló folyamat, melyet bizonyos fehérjék, többek között az integrinek sejten belüli aszimmetriája generál. A fagocitózis, illetve a parazitoid darázspete által kiváltott sejt-közvetítette immunválasz során a hemociták irányított sejt-vándorlását és alakváltozását Rho GTP-ázok családjába tartozó Rho, Rac és Cdc42 szabályozzák.

5. Van-e a rovarokban vírusfertőzés és az elleni védekező mechanizmus?

A rovarok alkotják az állatfajok 70%-át és a rovarokat fertőző vírusfajok száma és a diverzitása is példa nélkül álló. A rovar vírusok okozhatnak emberi megbetegedéseket, mint pl. a trópusi láz, vagy a zika láz, gazdasági károkat a méhek illetve selyemhernyók fertőzésével, de felhasználhatók biológiai védekezésként a komoly gazdasági károkat okozó rovarok megfékezésére.

A rovarokban változatos vírus ellenes stratégiák alakultak ki, amelyek közül az RNS interferencia tekinthető a legfontosabb vírusok elleni védekező mechanizmusnak. Egy másik, a rovarok által széleskörűen alkalmazott válaszreakció, a vírussal fertőzött sejtek apoptózisa és azok fagocita sejtek által történő lebontása. *Drosophilában* a flock house vírus, a picorna-szerű vírusok, a *Drosophila C* vírus és a *Cricket* paralysis vírus valamennyien a plazmatociták, azaz a *Drosophila* fagocita sejtjeinek aktív közreműködésével eliminálódnak. A rovarok a vírusfertőzésekre transzkripció szinten is reagálnak. Egyes vírusok ellen a JAK/STAT jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódik az anti-virális gének átíródása, más vírusok ellen a Toll és az IMD jelátviteli útvonalakban szerepet játszó NF- κ B családba tartozó transzkripció faktorok szabályozzák a vírusok elleni válaszreakciókat, de az ubiquitin proteasóma útvonal, az autofágia, vagy a hősokk válaszreakció is része lehet a rovarok vírus elleni védekezésének.

1. **Mi a viszonya a már ismert lymph gland-ban képződő hemociták és az általuk újonnan leírt szesszilis szövetben képződő vérsejt elemeknek. Lehet-e ezeket a humán primer és szekunder nyirokszervekhez hasonlítani?**

A *Drosophila* embrióban a központi vérképző szerv és a szesszilis szövet vérsejtjei egymástól jól elkülöníthető hemocita leszármazási vonalakat alkotnak. E két kompartmentum elemei az egyedfejlődés lárva stádiumában is elkülönülnek egymástól, amit genetikai és immunológiai markerek kombinált alkalmazásával igazoltunk. Immunindukciót követően azonban a két kompartmentumból származó vérsejtek a hemolimfába jutva keverednek egymással és együttesen vesznek részt a védekezésben. A szesszilis szövet és a központi nyirokszerv hasonlít a gerincesek primer és szekunder nyirokszerv-kompartimentumaihoz, azonban ez a hasonlóság – tekintettel arra, hogy a rovarok ősszájúak, a gerincesek pedig újszájúak és az elméletben létező közös ős, az Urbilateria fossziliája eddig még nem került elő (<http://tamop412a.ttk.pte.hu/files/biologia5/Evolucio/chunks/ch10s10.html>) – ezen struktúrák hasonlósága valószínűleg konvergens evolúció eredményeként jöhetett létre.

7. **A lárvákban észlelt nyirokszövetek a kifejlett állatokban hogy változnak az életkorral?**

A szakirodalomban sokáig tartotta magát az a nézet, hogy a *Drosophila* vérsejtképzése az emlőskökhöz hasonlóan két hullámban történik, a primitív vérképzés helye az embrionális feji

mezoderma, a definitív hematopoézis pedig a lárva központi vérsejtképző szervében, a lymph gland-ben zajlik. A lymph gland a bábozódás előtt szétesik és a benne fejlődött vérsejtek a keringésbe kerülve keverednek az embrionális eredetű vérsejtekkel, amelyek később az adultban is funkcionálnak. A közelmúltban derült fény arra, hogy a kifejlett egyedek dorzális abdominális részén, laminint és perikardint tartalmazó extracelluláris mátrix hálózatba ágyazottan olyan hemocita csoportosulások találhatók, melyek valódi vérsejtképző szövetnek tekinthetők. Ezekben a struktúrákban olyan osztódásra képes progenitor sejtek vannak, melyek *de novo*, plazmatocitákká vagy kristálysejtekké differenciálódhatnak. Továbbra is nyitott kérdés azonban, hogy mi lehet a kapcsolat az adult vérképző szöve és a lárvális szesszilis szövet között, melyben a hemociták sejtkapcsoló struktúrákkal (septate junctions), és citoplazma nyúlványokkal, ún. citonémákkal kapcsolódnak egymáshoz és a neuronális hálózathoz. Ilyen jellegű kapcsolatokat az adultban leírt hematopoetikus szövetben még nem találtak, ami a kifejlett állatok sejt-közvetítette immunitásának egyszerűbb szerveződésére utalhat. Az adult állatokban zajló sejt-közvetítette immunválaszról szerzett eddigi ismereteink szerint az életkor előrehaladtával a keringő vérsejtek száma és funkcióik hatékonysága egyaránt csökken. Azt még nem tudjuk, hogy az adult vérsejtek rendelkeznek-e a lárvális vérsejtekéhez hasonló plaszticitással vagy az adult vérsejtjei már olyan terminálisan differenciálódott sejtek, melyek elvesztették a lárvális vérsejtekre jellemző transz-differenciálódás képességét..

8a. A scramblase 1 génnek szerepe van a foszfatidil-szerin transzlokációban, amely az apoptózis korai jele. Scramblase 1 mutáns *Drosophila*-ban *B. cereus* fertőzés az életképesség csökkenését eredményezte. Mi a magyarázata, hogy csak ez az egy törzs okozott halálos fertőzést?

A sejt közvetítette immunválasz sikerességében alapvető szerepe van a mikroorganizmusok és a hasonló méretű részecskék bekebelezésének. Megfigyeléseink szerint a *Bacillus cereus*-t sem a *D. melanogaster* plazmatociták, sem az egér peritoneális makrofágok nem képesek belezni. A bekebelezés képességének hiánya hozzájárulhat az *ecetmuslica* életképességének csökkenéséhez, azonban arra vonatkozóan, hogy ez a jelenség hogyan kapcsolódhat a *scramblase 1* gén működéséhez, jelenleg nincsenek ismereteink. A *scramblase 1* gén fagocitózisban betöltött szerepét a következő kérdésre adott válaszomban fejtem ki.

8b. Mi a szerepe a foszfatidil-szerin sejt felszíni megjelenés mechanizmusának a sebgyógyulásban?

(Erre a kérdésre adott válaszom megegyezik Uher Ferenc Professzor Úr 5. kérdésére adott válaszával.)

A nyugvó állapotban lévő sejtek, így a vérsejtek plazmamembránban elhelyezkedő foszfolipidek aszimmetriáját is a foszfolipidek áthelyezésére specializálódott flippáz enzimek tartják fenn. Sejtaktiváció hatására az ún. Scramblase enzimek a foszfatidil-szerin molekulákat a külső membránba helyezik át, ami a lipidek aszimmetriájának megbontásával jár. Emlősökben a

Scramblase-1 fehérje a szöveti sérülések által előidézett véralvadás során a vérlemezkék belső membránjában lokalizálódó foszfatidil-szerint a sejtfelszínre juttatja, ami a véralvadási faktorokkal kapcsolatba lépve protrombin termelődést indukálva megindítja a véralvadási láncreakciót. Apoptózis során a fagocitózist beindító u. "eat me" szignált szintén a Scramblase-1 fehérje indukálja a foszfatidil-szerin külső membránba történő áthelyezésével, melyet a mikroglia és más professzionális fagocita sejtek érzékelnek és megkezdik a target sejt bekebelezését. A foszfolipidek transzlokációját végző, Scramblase-1-ről az is ismert, hogy emlősökben az interferonok hatására termelődik és meghatározó szerepet játszik a gazdaszervezet érő DNS- és RNS-vírus fertőzések, valamint a hepatocelluláris karcinóma elleni védekezésében. A Scramblase-1 fehérjét a hepatitis B Virus Protein X egyik interakciós partnereként is azonosították és megállapították, hogy elősegíti ennek a vírusfehérjének az ubiquitinálódását és proteaszómák általi lebontását. A human genom 4 *foszfolipid scramblase* gént kódol, melynek ortológjai megtalálhatók az egér, patkány, *Drosophila melanogaster*, a *Caenorhabditis elegans* és az élesztő genomjában is. A *Drosophila* Scramblase-1, az emlősökhöz hasonlóan, a foszfatidil-szerin sejtfelszínre juttatásával a szöveti sérüléseket követő sebgyógyulás folyamatában szerepet játszó jelátviteli útvonalakat aktivál.

A multicopper oxidázok olyan enzim molekulák, melyek aktív centrumai több réz iont tartalmaznak és különféle szubsztátok oxidációjára képesek. Emlősökben és madarakban a Ceruloplasmin EC 1.16.3 egy olyan ferroxidase, mely különböző szerves és szervetlen szubsztátokat oxidál, és részt vesz a véralvadék képződésében. A *Drosophila* genom 4 potenciális multicopper oxidázt (dMCO1-4) kódol, melyek közül a dMCO3 egy potenciális ferrooxidáz, amely az ion homeosztázis szabályozásában és ezen keresztül a szöveti sérüléseket követő sebgyógyulási folyamatokban, a hemolimfa alvadási folyamatában vesz részt.